

各種処理条件下におかれた海水活性汚泥の処理能と微生物相について

田邊幾之助・木佐木 博・園田登喜子・原田元弘・川路博志

(応用微生物学研究室)

昭和57年8月10日 受理

On the Treating Ability and the Microflora of the Sea-Water-Activated Sludge under Various Treating Conditions

Ikunosuke TANABE, Hiroshi KISAKI, Tokiko SONODA,

Motohiro HARADA and Hiroshi KAWAJI

(Laboratory of Applied Microbiology)

緒 言

前報で通常の処理条件下の海水活性汚泥の従来法による微生物相を明らかにした⁵⁾。また、フロックの構造性を明らかにするため通性嫌気下に活性汚泥をおくことによっておきる微生物相の変化を検討して来た⁶⁾。今回は、さらに、処理条件によって微生物相にどれだけの振れがおきるか、を明らかにする目的で研究を進めた。とくに、処理条件として焼酎蒸溜廃液について考えられる非常に苛酷な条件を送び半連続処理を行い、生物量としての DNA 量、汚泥の処理能および呼吸能、スポット寒天法による微生物相などの分析を行った。これは、苛酷な条件下の活性汚泥に現われる傾向は、通常の処理中の活性汚泥にトラブルの前兆として現われ、それをそれと読みとることができるのではないかという期待を持ったからにはほかならない。

方法と材料

処理条件は①標準 (25°C, 好気, 略中性), ②通性嫌気 (25°C), ③懸濁媒交換 (海水活性汚泥の場合なら、懸濁媒を水道水として処理を行う), ④高温 (40°C), ⑤酸性 (pH 4.0~4.5) の各条件で3週間、

* この研究は文部省科学研究費特定研究の研究補助金を受けて行ったものの一部で、昭和51年2月2日の研究発表会 (特定研究“微生物による環境浄化”研究報告, p. 336-338) で、また、「環境改善技術の微生物生態学に関するシンポジウム」(北海道大学農学部, 昭和52年8月26日, 講演要旨集 p. 1-2), 日農化西日本支部大会シンポジウム「微生物による難分解物の処理」(熊本工業大学, 昭和54年11月10日, 講演要旨集 p. 23) および「汚染防除技術における微生物の生態」シンポジウム (東京大学農学部, 昭和55年1月8日, 研究報告 p. 109-123) でその一部として講演した。

半連続処理を行った。

標準条件は処理温度 25°C, 通気量 2.0 l/l/min, pH 6.5~7.5, 負荷量 0.3 kg/m³/day, 出発時の汚泥量 10% で海水活性汚泥は懸濁媒が海水, 水道水活性汚泥の場合は水道水を用いた。通性嫌気条件とは通気量を 0 として静置する汚泥消化と同条件である。懸濁媒交換は標準条件から懸濁媒のみをすなわち海水活性汚泥の場合は水道水に、水道水活性汚泥の場合は海水に変えて処理を行うものである。また、高温条件とは処理温度のみを 40°C とし他は標準条件と同一、酸性条件は pH のみを pH 4.0 に 1 日平均 6 回の割合で調整して処理を行う。この場合、活性汚泥の緩衝能が大きく実験期間中絶えず pH 調整を必要とした。

分析は生物量の指標として Schmidt, Thannhauser, Schneider の方法で測定した DNA 量^{1, 2, 4)} ワールブルグ検圧計による汚泥呼吸量の測定³⁾, 回分式処理実験による 1 時間後の COD 除去率で示す処理能, スポット寒天面線平板法による微生物相⁷⁾ について行った。

処理実験およびワールブルグ検圧法用の汚泥試料の調製は次のように行った。混合液 100 ml をとり, 100 ml メスシリンダーで 30 分静置後汚泥容量を読む。普通 10% を目安とした。傾斜して上清を除いたあと滅菌した M/15 リン酸緩衝液, pH 6.98 (Na₂HPO₄·12H₂O, 14.28 g; KH₂PO₄, 3.62 g; 蒸留水, 1 l) または海水を加え, 懸濁し, 400 rpm 1 分間遠沈する。もう一度遠沈したのち再懸濁し全体を 100 ml とする。通常, これを処理実験, およびワールブルグ検圧法用に使用した。乾燥重はこのうち 20 ml をとり 3500 rpm 15 分間遠沈, 水道水活性汚泥の場合はこのまま 105°C で恒量とした。ただし海水活性汚泥の場合は一度水で洗浄

するために、これを水に再懸濁し遠沈したのち 105°C で恒量とした。

処理実験の反応混合液は 100 ml の三角フラスコに汚泥試料 30 ml, 5 倍稀釈した廃液 2 ml, 汚泥容量約 10% とした。1 時間振盪ののち COD を測定して COD 除去率を計算した。

ワールブルグ検圧法の反応混合液は主室に汚泥試料 2.0 ml, 滅菌水または滅菌海水を自家呼吸測定の際は 1.0 ml, 基質を 0.5 ml 加える時は 0.5 ml 加えてそれぞれ全量 3.0 ml とした。また、副室と側室へは 40% KOH 溶液 0.2 ml, 10% H₂SO₄ 溶液 0.3 ml をそれぞれ加えて呼吸測定を行った。

結果と考察

生物量としての DNA 量, 沈降能 (SVI), COD 除去率による処理能は Table 1 に示した, DNA 量は正常な活性汚泥では海水活性汚泥で 0.70~0.87%, 水道水活性汚泥で 1.45~1.66%。この値は処理条件が大きく変動しない限りは安定であった。ところが, 通性嫌気下や酸性下におかれたものはこの値のほぼ 60% に減少し, この両条件下, 微生物学的にみて大きな変化があったことを示している。また, 懸濁媒交換, すなわち, 海水活性汚泥を水道水中で馴養するとその DNA 量は水道水活性汚泥の DNA 量に近づき, 一方, 水道水活性汚泥を海水中で馴養するとその DNA 量は減

少して海水活性汚泥のそれに近づく傾向が認められた。このように生物量としての DNA 量の変化は環境に対応した大きな微生物相変化を示すものともとれ, その変化した環境が続くかぎり DNA 量も定常性を持つものと考えられる。

DNA 量とは異なり, 直接微生物に与える影響を読みとることができるのは処理能 (1 時間 COD 除去率) と呼吸能 (酸素消費量) である。Fig. 1 は正常な活性汚泥の懸濁媒を急に変えて酸素消費を測定し, 汚泥の呼吸に及ぼす影響を見たもので, 呼吸量の減少量に見合う 30~50% の微生物が懸濁媒変化にとくに感受性が高い結果と考えられる。ただ, 処理能も呼吸能も変化がそのまま定常性を持つようになると, 通性嫌気汚泥は別として, その状態に適応した微生物相ができてその能力が回復して来るように見える。Table 2 は馴養期間の 3 週間後に測定したものでこのことを支持しているように見える。とくに処理水の分離能の目安である SVI が比較的良好であるのはこのこと支持材料でもあろう。

ここで処理条件の変化によって DNA 量, 処理能, 呼吸能などにあらわれる変化が微生物相にどのように反映されるかを確かめるためスポット寒天平板法でそれぞれの活性汚泥から微生物を分離し, 微生物相を明らかにした。Table 3 に示したように標準条件 (25°C, 好気) 下海水活性汚泥では出発時, *Pseudomonas fluo-*

Table 1. DNA values of the activated sludges, COD removal and the settling abilities

Treating conditions	Tap water sludge			Sea water sludge		
	DNA (% dr. w.)	SVI	COD removal (%/hr)	DNA (% dr. w.)	SVI	COD removal (%/hr)
Control (at a start of treatment)	1.45	33.3		0.87	30.3	
Control (after 3 weeks treatment)	1.63	27.7	88.0	0.70	38.4	73.4
Incubation at 40°C measured at 40°C measured at 25°C	1.58	63.4	27.7 34.9	1.20	43.8	54.1 48.3
Suspending medium exchange, tap w. for sea w. and sea w. for tap w.	1.08	26.1	88.2	0.98	134.8	46.3
Anaerobic cultivation	1.17	44.5	13.2	0.55	36.2	12.5
Control (at a start of treatment)	1.66	35.6	79.4	0.40	35.1	62.3
Control (after 3 weeks treatment)	1.55	44.2	81.1	0.71	31.9	69.8
Incubation in an acid condition (pH 4.0) measured at pH 4.0 measured at pH 7.0	0.95	54.3	64.7 71.2	0.56	77.7	38.1 35.2

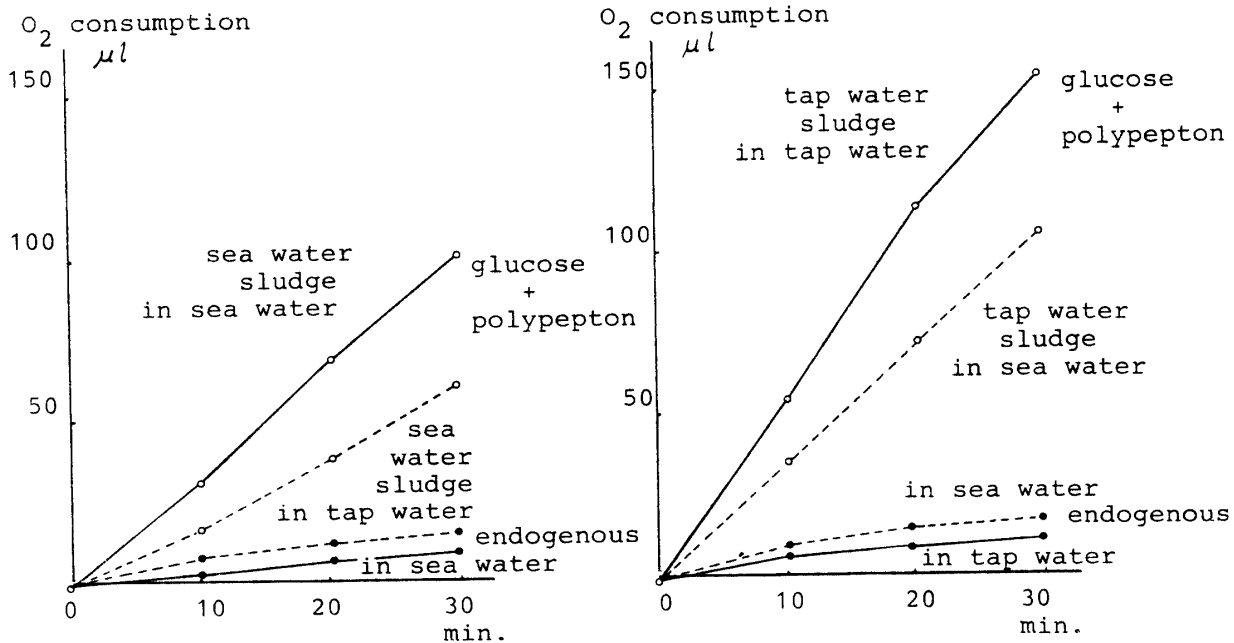


Fig. 1. Effects of the replacement of a suspending medium at measuring on oxygen consumption of the activated sludge.

Table 2. The treating ability of the sludge, having been acclimatized under various conditions

Treating conditions	Tap water activated sludge				Sea water activated sludge			
	Sludge volume (%)	SVI	COD removed for an hour (%)	O ₂ consumed for 30 min. μl	Sludge volume (%)	SVI	COD removed for an hour (%)	O ₂ consumed for 30 min. μl
Control (after 3 weeks treatment)	10.0	34.4	88.0	178.2	10.0	35.5	73.4	77.4
Incubation at 40°C measured at 40°C	10.0	72.5	31.0	25.4	10.0	40.2	58.6	69.5
	10.0	72.5	58.6	14.4	10.0	40.2	39.3	33.9
Suspending medium exchange, tap w. for sea w. and sea w. for tap w.	(sea w.-tap sludge)				(tap w.-sea sludge)			
	10.0	151.5	88.4	41.1	10.0	21.8	38.3	133.3
Anaerobic cultivation	10.0	29.1	10.7	2.3	10.0	67.1	15.0	10.6

rescens と *flavobacteria* および *coryne-form bacteria* が中心であったが、3週間後、*pseudomonad c-1* がこれに加わり大きな比重を占めた。しかし、懸濁媒交換では有胞子細菌 (*Bacillus* spp.) が大きな比重を占めるようになって特徴的である。これは元来、水道水活性汚泥の定常的な微生物相として *Bacillus* spp. の比重が大きいことと関連があるものと思われる。また通性嫌気下では前報⁷⁾での傾向と似た現象、すなわち *coryne-form bacteria* や *Bacillus* spp. が多数を占めるようになった。これらから *coryne-form bacteria p-1* は酸素分圧低下の指標微生物と考えてもよいであろう。また、焼酎蒸溜廃液の pH が 4.0 であることから混合液の pH を 4.0 に調整しながら半連続処理を行ったところ、

Table 3 に示したように菌類のみの微生物相が出来上り、分離 pH を 4.2 でも 7.2 にしても細菌の分離はほとんど認められなかった。

対照として行った水道水活性汚泥でも主要な微生物は Table 4 に示すように *Pseudomonas stutzeri*, *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., *corym-form bacteria*, *flavobacteria* であったが、標準状態でも3週間たつと、*Ps. stutzeri* と *Bacillus* sp. の微生物相に変っている。とくに水道水活性汚泥では常に有胞子細菌が多数分離されることが特徴であった。

以上両活性汚泥ともにそれぞれの条件に対応する決定的な指標微生物は見出せなかった。しかし、この中で注目してよいのは環境の変化が定常化するとそれに

Table 3. Frequency of occurrence of microorganisms in various cultural conditions
<Sea water sludge>

Type of colony Conditions	Spot	<i>Ps. fluor.*</i>				<i>ps.*</i>		<i>Gr*-</i>	<i>ps.</i>	<i>flav*/cor.*</i>		<i>fl.*</i>	<i>cor.</i>	<i>Bac.*</i>		<i>Bac.</i>	
		b-1	b-4	b-22	b-88	t-1	b-6	b-66	c-1	y-1	y-2	y-4	p-1	sp-1	sp-2	sp-3	
Control (at a start of treatment)	116	66	—	—	—	1	—	1	4	63	12	1	—	4	—	—	
Control (after 3 weeks treatment)	45	30	3	14	—	—	—	—	29	20	9	—	—	—	—	—	
Suspending medium-exchange, tap water sludge in sea water	45	—	25	—	—	5	18	—	2	20	—	5	—	—	—	41	
Incubation at 40°C	45	9	—	—	6	—	—	36	45	—	16	—	—	—	—	—	
Anoerobic cultivation	45	—	2	—	5	5	5	11	2	2	—	—	33	20	7	10	

Type of colony Conditions	Spot	<i>Ps. gram —</i>		<i>ps. flav.</i>		<i>cor. Bac.</i>		<i>Trich.*</i>	<i>Pen.* 1.</i>	<i>Pen.2.</i>	<i>Ceph.*</i>	molds	
		b-22	b-55	b-66	t-1	y-11	y-22						p-1
Control (at a start of treatment)	45	28	40	40	—	—	34	20	23	—	—	—	—
Control (after 3 weeks treatment)	54	17	12	20	14	1	—	—	12	—	—	—	32
pH 4.0 cultivation	45	—	—	—	—	—	—	—	—	18	35	19	19
isolation at pH 4.2	45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
isolation at pH 7.2	18	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	17

* *Ps. fluor.*: *Pseudomonas fluorescens*. *ps.*: *psendomonads*. *Gr-*: gram-negative bacteria. *flav.* or *fl.*: flavobacteria. *cor.*: coryne-form bacteria. *Bac.*: *Bacillus* sp. *Trich.*: *Trichoderma*-like mold. *Pen.*: *Penicillium* sp. *Ceph.*: *Cephalosporium*-like mold.

Table 4. Frequency of occurrence of microorganisms in various cultural conditions
<Tap water sludge>

Type of colony Conditions	Spot	<i>ps.*</i>		<i>Ps. stutzeri*</i>		<i>alc.*</i>	<i>Alc/ps.</i>	<i>Ps/Alc.</i>	<i>cor*/ent.*</i>	<i>fl/fl.</i>	<i>fl*/cor.</i>	<i>cor.</i>	<i>Bac.*</i>		<i>Bac.</i>
		b-1	b-11	b-111	b-2	c-1	t-1	w-1/ t-3	y-1	y-2	p-1	sp-1	sp-2		
Control (at a start of treatment)	94	6	—	52	—	57	—	78	—	30	—	68	—	—	
Control (after 2 weeks treatment)	45	6	26	1	3	—	1	1	—	—	—	—	—	45	
Suspending medium-exchange, sea water sludge in tap water	45	9	41	—	25	—	22	—	—	14	—	—	—	45	
Incubation at 40°C	45	—	30	30	—	—	—	15	15	—	45	45	—	—	
Anaerobic cultivation	45	9	—	—	2	—	—	4	—	—	—	34	—	1	

Condition	Spot	mold 1	mold 2	mold 3	mold 4	yeast	algae	others
pH 4.0 cultivation	45	34	12	4	4	1	3	7

* *ps.*: *pseudomonads*. *Ps. stutzeri*: *Pseudomonas stutzeri*. *alc.*: *Alcaligenes* sp. *cor.*: *Coryne-form* bacteria. *ent.*: *Enterobacteria*. *fl.*: *Flavobacteria*. *Bac.*: *Bacillus* sp.

対応した活性汚泥微生物相が形成され、処理能、処理水の分離能の点でも、少なくともトラブルの範疇には入らないことが示されたことである。Table 3 および Table 4 で示したように、とくに、酸性汚泥の場合はいずれもほぼ糸状菌のみの汚泥ができあがっていることである。pH 4.0 での半連続処理は Fig. 1 のように 1 日平均 6 回 pH を中和しなければならぬほど活性汚泥の緩衝力が強く、たとえ細菌は死滅してしまってもこの汚泥を形成していた物質がそのまま残存する限り、菌類のみからなる汚泥になったとしても Table 1 に示すように処理能にかなりの活性が認められる点で将来に興味をつなぐものである。したがって活性汚泥のトラブルであるバルキングが菌類による可能性ありとするが、これも、今後、以上の面から再検討すべきであろう。

要 約

海水活性汚泥で焼酎蒸溜廃液を非常に苛酷な処理条件、すなわち通性嫌気性下 (25°C)、懸濁媒交換、高温 (40°C)、酸性 (pH 4.0) などの条件で半連続処理した。この際、生物量としての DNA 量、処理能、呼吸能、SVI などを測定しその変化を調べた。正常な活性汚泥の DNA 量は海水活性汚泥で 0.70~0.87%、水道水活性汚泥で 1.45~1.66% であった。DNA 量は通常大きくは変動しなかったが、嫌気下や酸性下におかれるとこの値の 60% に減じ、呼吸能、処理能もそれともなって減少した。

一方、これらの微生物相を調べたところ、各条件に対応した微生物相が形成されていたが、酸性活性汚泥以外の場合ではそれぞれの条件に対応する決定的な指

標微生物は見出せなかった。この中で注目してよいと思われるのは酸性活性汚泥で、これは菌類のみからなる汚泥であったが、沈降性と処理能はそれぞれ SVI = 77.7, COD 除去率 (%/hr) = 38.1 (pH 4.0) で、少なくとも活性汚泥のトラブルの範疇に入るデータではなかった。

文 献

- 1) Marmur, T.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, **3**, 208-218 (1961)
- 2) Marmur, T. and Doty, P.: Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.*, **5**, 109-118 (1962)
- 3) Parsons, T. A. and Schapiro, H. C.: *Exercises in Cell Biology*. McGraw-Hill Book Company (1975)
- 4) Schneider, W. C.: Phosphorus compounds in animal tissues. III. Comparison of methods for the estimation of nucleic acids. *T. Biol. Chem.*, **164**, 747-751 (1964)
- 5) 田邊幾之助・土村幸広・吉井 石・木佐木 博・藤井正範: 海水活性汚泥の微生物相、とくに従来法による常在微生物相について。鹿大農学術報告, **No. 31**, 33-39 (1981)
- 6) 田邊幾之助・木佐木 博・原田元弘・川路博志: 海水活性汚泥の微生物相、とくにフロックの構造的な性質について。鹿大農学術報告, **No. 32**, 87-94 (1982)
- 7) 田邊幾之助・木佐木 博・原田元弘・川路博志: 海水活性汚泥中微生物の局在性の検討。鹿大農学術報告, **No. 32**, 95-100 (1982)
- 8) Tanabe, I., Fujii, M., Kamimura, Y., Yoshii, T., Kuboyama, H., Nagata-Machara, T., Kawaji, H. and Sonoda, T.: Studies on the biological treatment of the Shôchû-distiller's slops by the sea-water activated sludge. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **15**, 131-143 (1979)

Summary

Semi-continuous treatment of Shôchû-distiller's slops was carried out with the sea-water-activated-sludge under a few drastic treating-conditions:

1. under facultatively anaerobic condition
2. under such a condition, as the suspending medium is replaced with the other, for example, tap-water with sea-water.
3. at the constant temperature of 40°C.
4. being acidified to pH 4.0.

At the present experiment, amounts of the DNA of activated sludge as index of biomass, treating ability, respiration, and sludge volume index (SVI), were investigated.

Amounts of DNA in the normal activated-sludge were 0.70 to 0.87% for sea-water-activated-sludge, and 1.45 to 1.66% for tap-water-activated-sludge. Of these values violent variation was not observed, and the amounts of DNA in the activated-sludges under facultatively anaerobic condition,

or under an acid condition decreased by 40% for 3 weeks, compared with those under normal condition. Respiration and treating ability of the activated sludge decreased, in accordance with this change in the amounts of the DNA of activated sludge.

Microflorae of the activated sludge also were investigated under various treating conditions. They were found to be corresponding to their treating conditions, but no decisive index-microorganisms could be found, all through the respective treating conditions, excepting the case of acidified activated-sludge. Acidified activated-sludge almost consists of various molds, but its settling, and treating abilities; SVI of 77.7, and COD removal of 38.1 (%/hr, pH 4.0) respectively, these values are not applicable to the range of troubles in the activated-sludge-process.